

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Aktivierung von Makrophagen zur gesteigerten
Phagozytose und intrazellulären Keimabtötung
durch *Corynebacterium parvum*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin der
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
dem Medizinischen Fachbereich

vorgelegt von

Gerhard Keßel

aus Rehbach

Mainz 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552618_0022

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

AKTIVIERUNG VON MAKROPHAGEN ZUR GESTEIGERTEN
PHAGOZYTÖSE UND INTRAZELLULÄREN KEIMABTÖTUNG
DURCH CORYNEBACTERIUM PARVUM

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin der
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
dem Medizinischen Fachbereich

vorgelegt von

Gerhard Keßel
aus Rehbach

Mainz

1979



Dekan:

Prof. Dr. H. Leithoff

1. Gutachter:

Prof. Dr. H. Hahn

2. Gutachter:

Prof. Dr. U. Hadding

Meinen Eltern
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Resistenz und Immunität	1
1.2 Mononukleär - Phagozytäres System (MPS)	1
1.3 Künstliche Steigerung der Aktivität des MPS	2
1.4 Corynebacterium parvum	3
1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit	3
2. <u>Materialien und Methoden</u>	5
2.1 Mäuse	5
2.2 Bakteriologische Medien	5
2.3 Listeria monocytogenes	5
2.4 Corynebacterium parvum	5
2.5 Thioglykolat	6
2.6 Zellkulturmedien	6
2.7 Peritonealmakrophagen	6
2.8 Leighton - Röhrchen	6
2.9 Deckgläschen	7
2.10 Antikörper, Puffer, Komplement	7
2.11 In vitro - Bakterizidie	8
2.12 Phagozytose	9
2.13 Statistische Auswertung	10
3. <u>Ergebnisse</u>	11
3.1 Abtötung von Listeria monocytogenes in vitro durch Peritonealmakrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen	11
3.2 Phagozytose von opsonisierten Schaferythrozyten (IgG / IgM Gemisch) durch Peritonealmakrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen	11
3.3 Kinetik der Aufnahme opsonisierter Schaferythro- zyten (IgG / IgM Gemisch) durch Peritoneal- makrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen	18

3.4	Phagozytose IgG - opsonisierter Schafererythro- zyten durch Peritonealmakrophagen Corynebacterium parvum - behandelte Mäuse	21
3.5	Phagozytose von Schafererythrozyten durch Peritoneal- makrophagen Corynebacterium parvum - behandelte Mäuse bei Opsonisierung mit IgM und Mäusekomplement	21
3.6	Auftreten einer Erkennungsfähigkeit für C4b (vom Meerschweinchen) bei Corynebacterium parvum - aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus	24
3.7	Vergleich der Phagozytosesteigerung bei Mäuse- peritonealmakrophagen nach Stimulierung durch Corynebacterium parvum und Thioglykolat	27
4.	<u>Diskussion</u>	32
5.	<u>Zusammenfassung</u>	35
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	36

1. EINLEITUNG

1.1 Resistenz und Immunität

Der Ausgang der Auseinandersetzung zwischen dem Warmblüterorganismus und mikrobiellen Krankheitserregern bzw. Tumorzellen ist abhängig von Resistenz und Immunität. Hierbei bezeichnet man die unspezifische Widerstandsfähigkeit eines Organismus als Resistenz. Diese ist nicht antigenspezifisch und hängt von genetischen und allgemeinen Bedingungen ab (Krankheit, Ernährungszustand, Streß). Demgegenüber bezeichnet Immunität diejenige Abwehrfähigkeit, die durch den Besitz spezifischer Produkte des Immunsystems gekennzeichnet ist. Hierzu gehören humorale Antikörper und die spezifisch reagiblen T - Lymphozyten (zelluläre spezifische Immunfaktoren).

1.2 Mononukleär - Phagozytäres System

Die zellulären Resistenzfaktoren werden durch die polymorphkernigen Granulozyten und die Zellen des Mononukleär - Phagozytären Systems (MPS) repräsentiert. Als MPS werden die Abkömmlinge einer einheitlichen Stammzelle, des Promonozyten im Knochenmark, bezeichnet. Das MPS umfaßt die Histiozyten, Alveolarmakrophagen, von Kupffersche Sternzellen, Lymphknotenmakrophagen, Makrophagen der serösen Höhlen, Blutmonozyten und Mikroglia - Zellen (42). Die Leistungen des MPS bestehen in der Phagozytose und Abtötung von Bakterien, Viren, Protozoen und Tumorzellen. Für diese Aufgaben besitzen die Zellen des MPS Membranrezeptoren bzw. Akzeptoren, die die Anlagerung von Teilchen ermöglichen und den Aufnahmeprozeß in Gang bringen (5, 13, 18, 19, 20, 31). Durch die Verbindung mit humoralen Faktoren (sogenannte Opsonine) werden Partikel (z.B. Fremdzellen,

Viren, Bakterien) für Rezeptoren besser erkennbar. Zu den Opsoninen gehören spezifische Antikörper und C3b, ein Spaltprodukt der dritten Komplementkomponente (12, 13, 31).

Die Leistungen des MPS lassen sich endogen durch das Immunsystem steigern und koordinieren. So kann einerseits im Sinne einer immunologisch spezifisch induzierten Steuerung durch Produkte antigenstimulierter spezifischer T - Lymphozyten eine lokale Anhäufung von Makrophagen (Granulombildung) herbeigeführt werden; weiterhin werden Makrophagen durch solche Produkte aktiviert (9, 25, 26, 27, 28, 33, 34). Die Aktivierung stellt einen Adaptationsvorgang der Makrophagen dar, der sich je nach gewählter Untersuchungsmethode als gesteigerte Synthese oder Sekretion von Enzymen, erhöhte Spreizaktivität, vermehrter Lysosomen - und Mitochondriengehalt, gesteigerte Phagozytose oder gesteigerte Bakterizidie darstellt (4, 10, 14, 29, 32, 37, 41). Aktivierter Makrophagen sind das hauptsächliche Abwehrinstrument bei Infektionen mit fakultativ intrazellulären Bakterien (10). Dieser Ausdruck bezeichnet Bakterien, die im Inneren phagozytierender Zellen überleben und sich dort vermehren können.

1.3 Künstliche Steigerung der Aktivität des MPS

Die heutige Therapie von Infektions - und Tumorerkrankungen basiert vor allem auf der Verabreichung von Chemotherapeutika (Antibiotika bzw. zytostatische Substanzen). Die Beobachtung, daß Effektorzellen endogen aktiviert werden können und sich dadurch ihre Leistung gegen Mikroorganismen und Tumorzellen steigern läßt, läßt den Versuch, die Produktion und die Funktionsfähigkeit von Resistenz - und Immunfaktoren künstlich zu erhöhen, als logische Ergänzung der

obengenannten Behandlungsmethoden erscheinen.

Bei dem Versuch, durch Adjuvantien die Antikörpersynthese zu steigern, zeigte sich, daß gewisse Substanzen - vor allem Zellwandbestandteile verschiedener Bakterienarten - nicht nur die Antikörperbildung fördernd beeinflussen, sondern daß sie darüberhinaus eine Hyperplasie und Aktivitätssteigerung der Zellen des MPS herbeiführen (2). Eine Aktivierung dieser Zellen durch Anwendung bakterieller Zellwandbestandteile (d.h. Steigerung ihrer Reaktionsfähigkeit gegenüber körperfremden Partikeln, ihrer Phagozytoseaktivität und ihrer intrazellulären Abtötungsleistung gegen Mikroorganismen) erscheint daher vom medizinischen Standpunkt aus gesehen als sinnvolles Unterfangen.

1.4 Corynebacterium parvum

Corynebacterium parvum ist ein grampositives, anaerob wachsendes, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium. Es gilt als eines der wirksamsten bekannten Stimulantien des MPS. Ferner besitzt es Adjuvans - Wirkung (17, 36, 44) und vermittelt einen antiinfektiösen Schutz bei bakteriellen (1, 39), Protozoen - (38) und Tumorerkrankungen (8, 11, 35, 45, 46).

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die zitierten Befunde sind vorwiegend am Ganztier erhoben worden, ohne daß der Beitrag einzelner Zellsysteme klar abgegrenzt worden wäre. Es erschien daher wünschenswert, die durch Corynebacterium parvum bewirkten Leistungssteigerungen der Zellen des MPS an isolierten Makrophagen in vitro zu quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch gemacht, die Leistungssteigerungen der Zellen des MPS durch Corynebacterium parvum an der Phagozytose in-
erter Partikel (opsonisierte Schaferythrozyten) und

anhand der Abtötungsfähigkeit für das intrazellulär
vitale Bakterium *Listeria monocytogenes* zu messen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Mäuse

Für alle Versuche wurden Mäuse der Stämme NMRI (Ivanovas, Kisslegg i. Allgäu, später aus eigener Zucht) und CD - 1 (Charles River Laboratories, Wilmington, Mass., später ebenfalls aus eigener Zucht) verwendet. Das Gewicht betrug zu Versuchsbeginn bei sämtlichen Tieren 20 - 25 g. Alle Mäuse erhielten Trockenfutter (Altromin) und Wasser ad libitum. Für eine Versuchseinheit wurden entweder nur männliche oder nur weibliche Tiere verwendet.

2.2 Bakteriologische Medien

Die Inkubation von *Listeria monocytogenes* erfolgte in Typtone - Soya - Bouillon (Oxoid).

2.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, Stamm EGD, wurden durch regelmäßige Mäusepassagen virulent gehalten. Für die Gewinnung von Bakterien wurde eine infizierte Maus getötet, die Milz steril entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Eine Probe von 0,1 ml wurde anschließend in Tryptone - Soya - Bouillon 12 Stunden bei 37° C inkubiert. Die erhaltene Suspension enthielt Bakterien in der log - Wachstumsphase und wurde für Versuchszwecke verwendet.

2.4 *Corynebacterium parvum*

Corynebacterium parvum wurde als fertige Suspension abgetöteter Bakterien von Wellcome Research Laboratories (Beckenham, Kent, England) bezogen (CN 6134, Batch PX 374 und PX 398, 7 mg Trockengewicht pro ml).

2.5 Thioglykolat

Thioglykolat wurde als Pulver von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. In der Gebrauchslösung betrug die Konzentration 30 g/l. Die Auflösung erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung.

2.6 Zellkulturmedien

Für die Bakterizidieversuche wurde Medium 199 mit Hanks' Salzen (Flow Laboratories, Cat. No. 1 - 043 D; 0,35 g NaHCO_3 / l) mit Zusatz von Pferdeserum (Endkonzentration 40 %) (Flow Laboratories, Cat. No. 4 - 012 D) und 5 I.E. Heparin / ml (Thrombophob ad injectionem, Nordmark), für die Phagozytoseversuche Medium 199 (Serva Feinbiochemika, Heidelberg) mit 5 I.E. Heparin / ml benützt. Bei beiden Medien betrug der pH - Wert 7,2 bei offener Inkubation in einer Atmosphäre aus Luft und 5 % CO_2 .

2.7 Peritonealmakrophagen

Durch zervikale Dislokation getötete Mäuse wurden in Rückenlage auf einer Arbeitsplatte befestigt. Nach Desinfektion des Abdomens mit 70 % igem Aethylalkohol wurde mit einer Pinzette das Fell im unteren Drittel der Medianlinie angehoben und mit einer Schere ein kleiner Schnitt gelegt. Dabei blieb die Peritonealhöhle unversehrt und das Fell konnte nach oben weggezogen werden. Mit einer Kanüle Nr. 1 wurden dann 3 ml kaltes Medium (4°C) intraperitoneal injiziert. Nach vorsichtiger Massage des Bauchinhaltes (ca. 50 mal) wurden 2 ml Zellsuspension entnommen.

2.8 Leighton - Röhrchen

Für die Phagozytoseversuche wurden Leighton - Röhrchen der Bellco Inc. Vineland N.J. mit dazu passendem Ständer benützt.

2.9 Deckgläschen

Die Deckgläschen (Menzelgläser, 9 x 35 mm und 10 x 30 mm) für die Herstellung von Makrophagenrasen wurden nach folgendem Schema behandelt:

50 % ige Schwefelsäure	18 h
fließendes Wasser	30 min
kochende 20 % ige RBS 50 Lösung (Fa. Roth)	15 min
fließendes Wasser	30 min
Aqua dest.	10 x spülen
Propylalkohol	10 min
anschließend kurz abflammen, in Leighton - Röhrchen geben und sterilisieren.	

2.10 Antikörper, Puffer, Komplement

Gereinigte Anti - Forssman Antikörper (IgG, IgM) wurden von der Firma Cordis (Miami, USA) bezogen. Der Reinheitsgrad wurde immunoelektrophoretisch geprüft. Anti - Schafererythrozyten - Antikörper vom Kaninchen (Behring Ambozeptor, Gemisch aus IgG und IgM) sind bei den Behringwerken (Marburg) erhältlich.

Als Puffer gelangten VBS-S (Veronal buffered saline with added sucrose) und VBS_{EDTA} (VBS mit EDTA - Zusatz) zur Anwendung. Handhabung von Puffern und Komplement erfolgte nach Rapp und Borsos sowie Colten (40, 7). Die Komplementkomponenten wurden mit Ausnahme des in 3.5 verwendeten Komplements von Cordis (Miami, USA) bezogen.

Erythrozyten - Antikörper - Komplexe (EA) wurden auf folgende Weise hergestellt: Schafererythrozyten wurden gewaschen und auf eine Konzentration von $1,3 \times 10^8$ Zellen / ml VBS_{EDTA} eingestellt. Anschließend erfolgte Inkubation bei 37° C (20 min) mit dem gleichen Volumen der Antikörperverdünnung. Danach einmal Waschen mit VBS_{EDTA}, zweimal mit VBS-S und Aufnahme im Ausgangsvolumen.

EAC1423 - Zellen wurden wie folgt hergestellt:

EA_{IgM} in einer Konzentration von $1,3 \times 10^8$ Zellen / ml VBS-S wurden mit dem gleichen Volumen C1 (500 effektive Moleküle / Zelle) für 15 Minuten bei 0° C inkubiert. Anschließend zweimaliges Waschen. EAC1 - Zellen ($1,3 \times 10^8$ / ml) wurden dann für 60 Minuten bei 0° C mit dem gleichen Volumen von partiell gereinigtem C4 (200 effektive Moleküle / Zelle) inkubiert, gewaschen und wieder in der Ausgangskonzentration aufgenommen. EAC14 - Zellen wurden anschließend mit demselben Volumen einer aus gleichen Teilen bestehenden Mischung aus C2 (100 Moleküle / Zelle) und der jeweiligen C3 - Verdünnung (Titer 70 U / ml, Verdünnungen 1:3, 1:9, 1:27 usw.) inkubiert (15 Minuten, 30° C).

Als Komplement - Quelle für die in 3.5 beschriebenen Versuche diente Serum C5 - defekter Mäuse des Stammes B 10 D 2 / O SN (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA). Zur Anwendung wurde das Serum 1:10 verdünnt und für 30 Minuten mit den EA bei 37° C inkubiert.

2.11 In vitro - Bakterizidie

NMRI Mäuse erhielten 0,28 ml (1,96 mg) *Corynebacterium parvum* intravenös. Sieben Tage später wurden 1×10^6 *Listeria monocytogenes* (in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung) in die Peritonealhöhle injiziert. Nach 5 Minuten für die Keimaufnahme durch die Peritonealmakrophagen wurden die Zellen wie oben beschrieben entnommen und auf 4 Plastikröhrchen (C.A. Greiner und Söhne, Nürtingen) Nr. 1 - 4 verteilt. Röhrchen 2 - 4 wurden bei 37° C inkubiert. Aus Röhrchen 1 wurde 0,1 ml der Suspension entnommen und nach Verdünnung (1:100 in physiologischer Kochsalzlösung) jeweils 0,1 ml auf einen Drittelsektor einer Agarplatte gegeben und bei 37° C für 24 Stunden inkubiert. Mit den übrigen Röhrchen wurde nach 20, 40 und 60 Minuten in gleicher

Weise verfahren. Außerdem wurde mit den Suspensionsresten der Röhrchen die Zellkonzentration der ausgewaschenen Suspension bestimmt.

Nach Inkubation der beimpften Platten erfolgte die Auswertung. Aus den in den Drittelsektoren gefundenen Koloniezahlen wurden die Zahlen der in den Peritonealmakrophagen enthaltenen lebenden Bakterien errechnet. Der Wert der ersten Probe wurde als Referenzpunkt gewählt und gleich 100 % gesetzt. Die Werte für die bei 20, 40 und 60 Minuten entnommenen Proben wurden in Prozenten des Ausgangswertes angegeben und grafisch dargestellt (Abszisse = Zeit, Ordinate = Prozentwerte). Die Ordinatenwerte für die nach 20, 40 und 60 Minuten entnommenen Proben wurden addiert. Dieser Wert (Σy - Wert) ist ein Maß für die unter der Kurve liegende Fläche, die ihrerseits ein umgekehrt proportionales Maß für die Abtötungsfähigkeit gegenüber Bakterien darstellt.

2.12 Phagozytose

NMRI Mäuse erhielten 0,28 ml (1,96 mg) *Corynebacterium parvum* intravenös. Am 7. Tag post injectionem erfolgte die Gewinnung der Peritonealzellen wie beschrieben. Die Suspension wurde in silikonisierte Glasröhrchen gegeben und 10 Minuten bei 1200 U / min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und die Zahl der vitalen Zellen durch Färbung mit Eosin Y bestimmt. Die Konzentration wurde auf $1,5 \times 10^6$ lebende Zellen / ml eingestellt. 0,75 ml der Zellsuspension wurde in Leighton - Röhrchen (mit Deckgläschen versehen) gegeben und für 60 Minuten bei 37° C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Medium bestand der Zellrasen auf den Deckgläschen zu mehr als 80 % aus Peritonealmakrophagen (morphologische Kriterien). Auf die Zellrasen wurden $1,6 \times 10^7$ Schaferferythrozyten

(SRBC) (in 0,8 ml Medium) pro Leighton - Röhrchen gegeben und inkubiert (60 min, 37° C, 5 % CO₂). Nach zweimaligem Waschen wurden die extrazellulären Erythrozyten durch Zugabe von Tris - ammoniumchlorid - Puffer (1 ml pro Röhrchen, 1 Minute Einwirkzeit bei 37° C) lysiert. Danach wurde erneut zweimal gewaschen, die Präparate luftgetrocknet und nach Pappenheim gefärbt. Für die Auswertung wurde die Zahl der intrazellulären Erythrozyten pro Peritonealmakrophage bestimmt und 200 bzw. 500 ausgezählte Makrophagen in Gruppen mit 0, 1 - 2, 3 - 4, 5 und mehr phagozytierten Erythrozyten eingeteilt. Die Gesamtzahl der von den Peritonealmakrophagen aufgenommenen Erythrozyten wurde dargestellt.

2.13 Statistische Auswertung

Sowohl für die Listerizidie - Versuche als auch für die Phagozytose - Untersuchungen wurde bei der statistischen Auswertung der Vorzeichentest angewandt. Er beruht auf der Bildung der positiven und negativen Differenzen der Ergebnisse zu den einzelnen Versuchspaaren. Anhand standardisierter Tabellen kann dann untersucht werden, ob ein statistisch signifikanter Behandlungsunterschied vorliegt.

Die grafisch dargestellten Versuche wurden anhand von Zufallszahlentabellen ausgewählt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Abtötung von Listeria monocytogenes in vitro durch Peritonealmakrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen

Zur Bestimmung der bakteriziden Eigenschaften gegenüber dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* wurden Peritonealmakrophagen aus *Corynebacterium parvum* - stimulierten und nicht behandelten Kontrollmäusen (wie in Materialien und Methoden angegeben) ausgewaschen und behandelt. Die Ergebnisse sämtlicher durchgeführten 13 Experimente sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Peritonealmakrophagen aus *Corynebacterium parvum* - behandelten Mäusen zeigen eine signifikant gesteigerte Abtötungsleistung gegenüber *Listerien*. In Abb. 1 ist der Ausfall eines Einzelversuches grafisch dargestellt (Vers. 13 aus Tab. 1).

Es bestand kein Zusammenhang zwischen den Zahlen der ausgewaschenen Zellen (Tab. 2) und der Abtötungsleistung (siehe Korrelationsdiagramm (Abb. 2)).

3.2 Phagozytose von opsonisierten Schafererythrozyten (IgG / IgM Gemisch) durch Peritonealmakrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen

Peritonealmakrophagenrasen wurden für die Bestimmung der Phagozytose mit opsonisierten SRBC beschickt und die Aufnahmeleistung nach 60 Minuten gemessen. Bei allen 9 Versuchen (mit Einzeltieren) ergaben sich signifikante Steigerungen der Phagozytoseleistung durch die Vorbehandlung (Tab. 3). Die Steigerungen lagen im Durchschnitt bei 188 %.

Der Ausfall zweier Experimente ist in Abb. 3 wiedergegeben (Vers. 4 und 7 aus Tab. 3).

Der beschriebene Versuch zeigt den Vergleich der Phagozytoseleistung zwischen Zellen aus behandelten und

Tab. 1

Zusammenfassende Darstellung der Versuche zur listeriziden Leistung von Peritonealmakrophagen aus normalen und *Corynebacterium parvum* - behandelten Mäusen. Die Auswertung erfolgte wie in Materialien und Methoden angegeben.

Vers. Nr. ¹⁾	C. parvum behandelte Tiere			$\sum y$	Kontrolltiere			$\sum y$
	Ordinatenwerte in %				Ordinatenwerte in %			
	20 min	40 min	60 min		20 min	40 min	60 min	
1	41,8	24,4	16,4	82,6	67,3	46,0	29,3	142,6
2	66,2	32,0	26,6	124,8	88,1	78,8	58,1	225,0
3	70,2	17,4	21,3	108,9	92,5	56,5	43,5	192,5
4	66,1	10,5	8,6	85,2	87,8	33,6	19,7	141,1
5	50,3	11,4	4,3	66,0	85,8	48,0	49,4	183,2
6	56,0	23,1	12,7	91,8	96,9	37,5	28,1	162,5
7	51,9	22,7	9,7	84,3	71,9	27,6	14,3	113,8
8	51,7	22,7	12,6	87,0	89,6	27,1	24,0	140,7
9	23,4	8,5	4,3	36,2	52,6	15,8	11,6	80,0
10	25,0	9,4	3,1	37,5	26,6	13,8	5,5	45,9
11	36,1	14,8	9,8	60,7	68,3	24,4	12,2	104,9
12	34,8	11,1	5,5	51,4	56,8	16,0	8,0	80,8
13 ²⁾	15,6	5,3	2,7	23,6	57,0	35,5	25,3	117,8

1) Ein Tier pro Versuch

2) grafisch dargestellt in Abb. 1

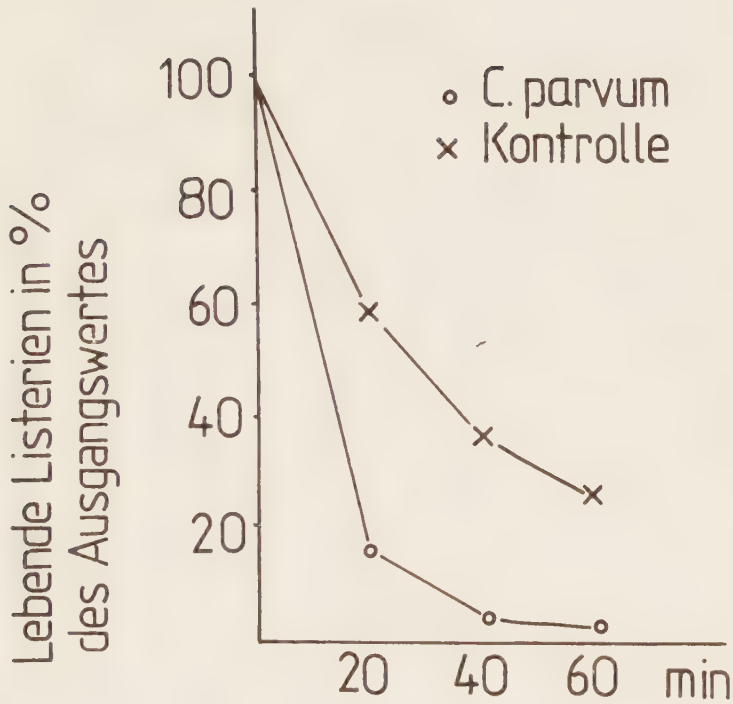


Abb. 1 : Listerizidie von Peritonealmakrophagen aus normalen und *Corynebacterium parvum* - behandelten Mäusen.

Vers. 13 aus Tab. 1 .

Tab. 2

Zahl der bei den in Tab. 1 wiedergegebenen Experimenten ausgewaschenen Peritonealzellen bei normalen und *Corynebacterium parvum*-behandelten Mäusen.

Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied.

Vers. Nr.	Zellen im Peritonealauswasch ($\times 10^6$ / ml)	
	C. parvum behandelte Tiere	Kontrolltiere
1	2,05	1,00
2	1,40	1,45
3	1,95	1,35
4	2,50	2,55
5	2,45	2,70
6	2,60	2,75
7	2,75	2,00
8	2,70	1,70
9	2,00	2,10
10	1,15	2,30
11	2,30	1,40
12	1,75	1,45
13	2,35	3,50

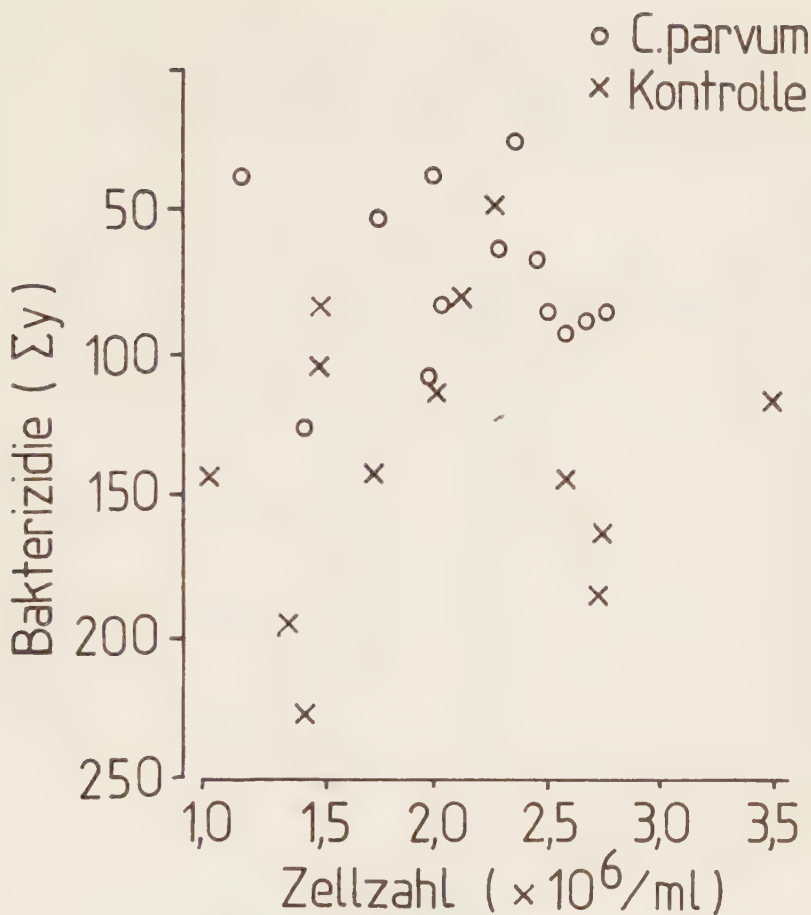


Abb. 2 : Korrelationsdiagramm zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der ausgewaschenen Zellzahl und der Abtötungsleistung. Es findet sich keine statistisch signifikante Abhängigkeit.

Tab. 3

Phagozytose von opsonisierten Schaferythrozyten
(IgG / IgM Gemisch) durch Peritonealmakrophagen
aus normalen und *Corynebacterium parvum*-stimulierten
Mäusen.

Vers. ¹⁾ Nr.	Phagozytierte Erythrozyten ²⁾	
	<i>C. parvum</i>	Kontrolle
1	1277	550
2	974	637
3	1096	726
4 ³⁾	808	274
5	778	447
6	1254	212
7 ³⁾	841	389
8	689	287
9	1342	230

1) Ein Tier pro Versuch

2) pro 500 ausgezählte Makrophagen

3) grafisch dargestellt in Abb. 3

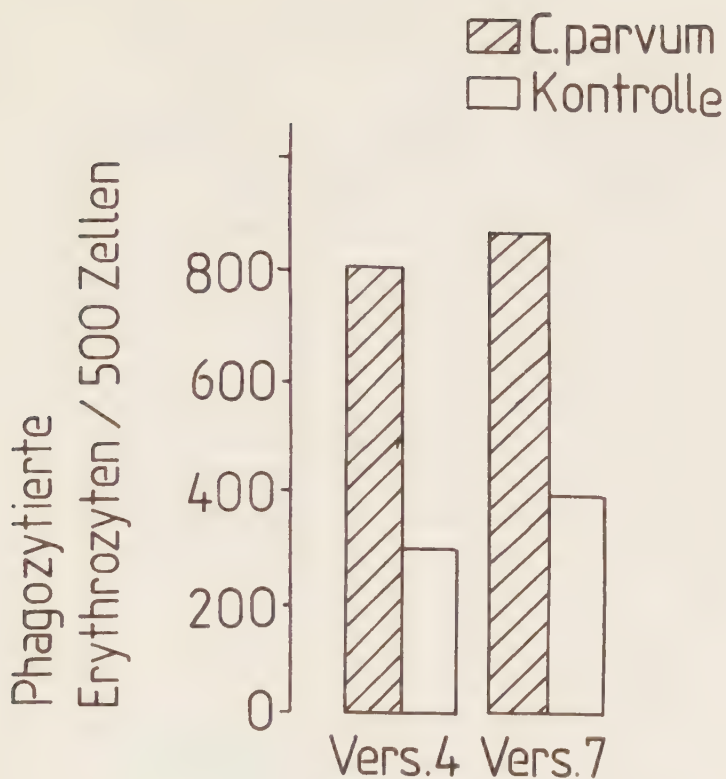


Abb. 3 : Phagozytose von opsonisierten Schaferythrozyten (IgG / IgM Gemisch) durch Peritonealmakrophagen nach *Corynebacterium parvum* - Behandlung.

Grafische Darstellung der Versuche Nr. 4 und 7 aus Tab. 3 .

und unbehandelten Tieren zu einem willkürlich gewählten Zeitpunkt. Im folgenden Experiment wurde die Kinetik der Erythrozytenaufnahme verglichen.

3.3 Kinetik der Aufnahme opsonisierter Schafererythrozyten (IgG / IgM Gemisch) durch Peritonealmakrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen

Die Makrophagen eines gegebenen Versuches stammten aus Zellsuspensionen mehrerer Mäuse. Aus einem Zellpool wurden 8 Proben für jeweils 4 Doppelansätze entnommen und nach 10, 20, 30 und 60 Minuten die Zahl der phagozytierten Erythrozyten bestimmt. In Tab. 4 sind die Ergebnisse sämtlicher Versuche zusammengefaßt. Die Aktivierung der Makrophagen Corynebacterium parvum - behandelter Mäuse drückte sich in einer gesteigerten Rate der Erythrozytenaufnahme aus. Die Steigerung war in der Frühphase besonders ausgeprägt; sie betrug im Vergleich zu den Kontrollen im Durchschnitt

nach 10 Minuten	893 % ,
nach 20 Minuten	342 % ,
nach 30 Minuten	154 % und
nach 60 Minuten	108 % .

In Abb. 4 ist der Ausfall eines Experimentes grafisch dargestellt (Vers. 6 aus Tab. 4).

Die bisherigen Versuche wurden mit Behring - Ambozeptor - opsonisierten Erythrozyten durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Gemisch von IgG - und IgM - Antikörpern. In den folgenden Experimenten wurde gereinigtes IgG bzw. IgM benutzt. Es galt festzustellen, ob sich die Aktivierung durch Corynebacterium parvum in einer unterschiedlichen Steigerung der Aufnahme-fähigkeit für IgG und IgM ausdrückt.

Tab. 4

Kinetik der Aufnahme opsonisierter Schaferythrozyten (IgG / IgM Gemisch)
durch Peritonealmakrophagen aus normalen und *Corynebacterium parvum* -
stimulierten Mäusen.

Vers. Nr.	1		2		3		4		5		6 ¹⁾		7		8		9	
	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K
10'	92	3	149	36	143	15	69	6	36	4	90	9	40	10	45	6	47	15
20'	223	30	226	113	195	42	154	21	89	41	133	20	153	66	229	74	202	47
30'	214	45	258	140	166	51	189	63	84	63	232	68	240	148	180	101	254	127
60'	288	121	319	211	201	108	183	106	182	80	405	171	603	194	274	145	485	261

1) Grafisch dargestellt in Abb. 4

Cp = *Corynebacterium parvum* - Behandlung
K = Kontrolle

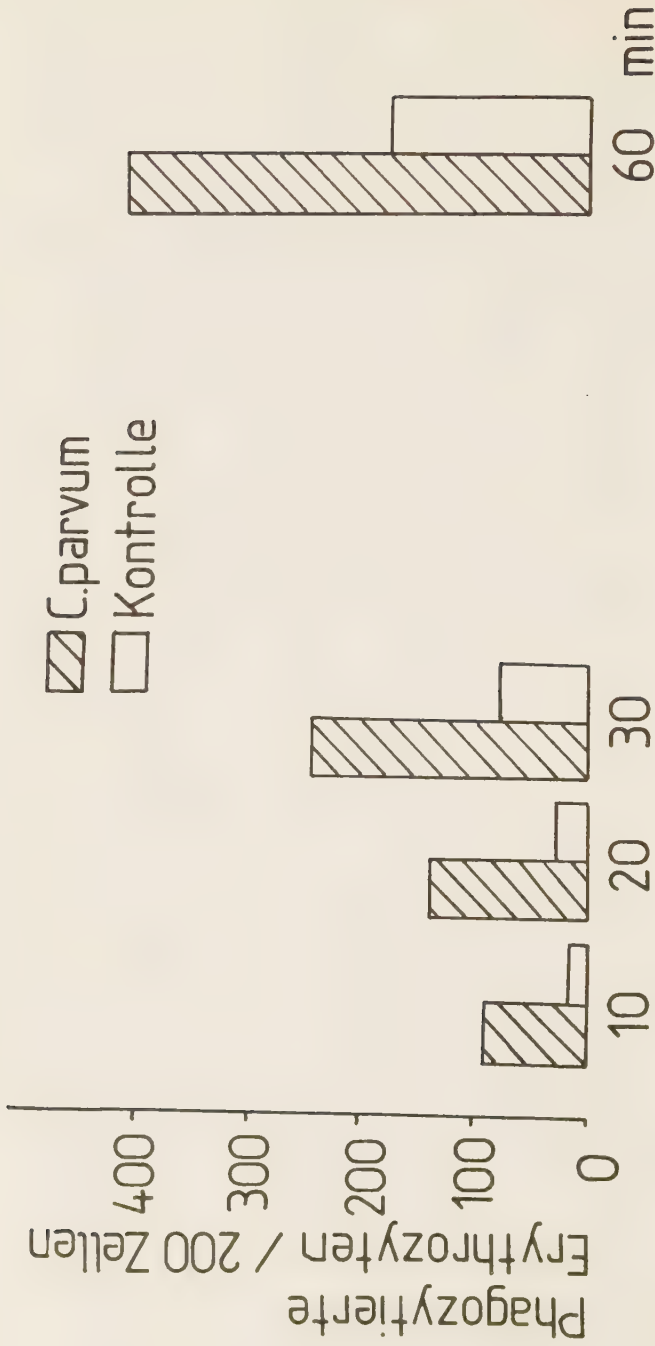


Abb. 4 : Kinetik der Aufnahme opsonisierter Schafererythrozyten (IgG / IgM Gemisch)
durch Peritonealmakrophagen nach Corynebacterium parvum - Behandlung.
Grafische Darstellung des Versuchs 6 aus Tab. 4 .

3.4 Phagozytose IgG - opsonisierter Schafererythrozyten durch Peritonealmakrophagen Corynebacterium parvum - behandelte Mäuse

Aus einem Pool von Peritonealmakrophagen normaler bzw. Corynebacterium parvum - stimulierter Tiere wurden Zellrasen hergestellt und mit Schafererythrozyten für die Phagozytose beschickt, die mit IgG (Cordis) in verschiedenen Verdünnungen opsonisiert waren. Die Phagozytosezeit betrug 60 Minuten. Insgesamt wurden 8 Experimente durchgeführt, die in Tab. 5 zusammengefaßt sind. Es zeigte sich dabei wieder, daß Peritonealmakrophagen aus Corynebacterium parvum - behandelten Mäusen eine signifikant stärkere Phagozytoseleistung erbringen. Die unterschiedliche Leistung wurde besonders deutlich, wenn die IgG - Konzentration, die zur Opsonisierung benutzt wurde, unterhalb der Optimalkonzentration lag.

In Abb. 5 ist ein Experiment grafisch dargestellt (Vers. 3 aus Tab. 5).

3.5 Phagozytose von Schafererythrozyten durch Peritonealmakrophagen Corynebacterium parvum - behandelte Mäuse bei Opsonisierung mit IgM und Mäusekomplement

Im Folgenden wurde geprüft, ob die Aktivierung der Makrophagen durch Corynebacterium parvum auch dann nachgewiesen werden kann, wenn die Schafererythrozyten mit IgM und Mäusekomplement opsonisiert sind.

Insgesamt wurden 8 Versuche, jeweils mit Einzeltieren, durchgeführt. Peritonealmakrophagenrasen wurden in der beschriebenen Weise hergestellt und zur Phagozytose mit Schafererythrozyten beschickt. Die benutzte IgM - Verdünnung betrug konstant 1 / 250. Als Komplementquelle gelangte Serum C5 - defekter Mäuse in der Verdünnung 1 / 10 zur Anwendung. Die Zahl der aufgenommenen Erythrozyten wurde nach 60

Tab. 5

Phagozytose von Schafererythrozyten durch Peritonealmakrophagen normaler und *Corynebacterium parvum* - behandelter Mäuse bei Opsonisierung mit verschiedenen Konzentrationen gereinigter IgG - Antikörper.

EA	Versuch Nr.	1		2		3		4		5		6		7		8	
		Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K
EA IgG (1/200)	303	229	186	269	186	345	181	453	183	449	268	329	249	330	205	314	238
EA IgG (1/600)	196	145	125	245	125	287	81	368	97	288	133	295	142	228	79	335	120
EA IgG (1/1800)	62	68	35	140	35	113	34	168	6	187	68	154	23	55	8	228	28
EA IgG (1/5400)	8	7	13	24	13	32	5	33	1	62	11	26	4	12	4	11	0
EA IgG (1/16200)	1	2	6	8	6	2	3	13	4	24	4	7	1	2	3	2	0

1) grafisch dargestellt in Abb. 5

Cp = *Corynebacterium parvum* - Behandlung
K = Kontrolle

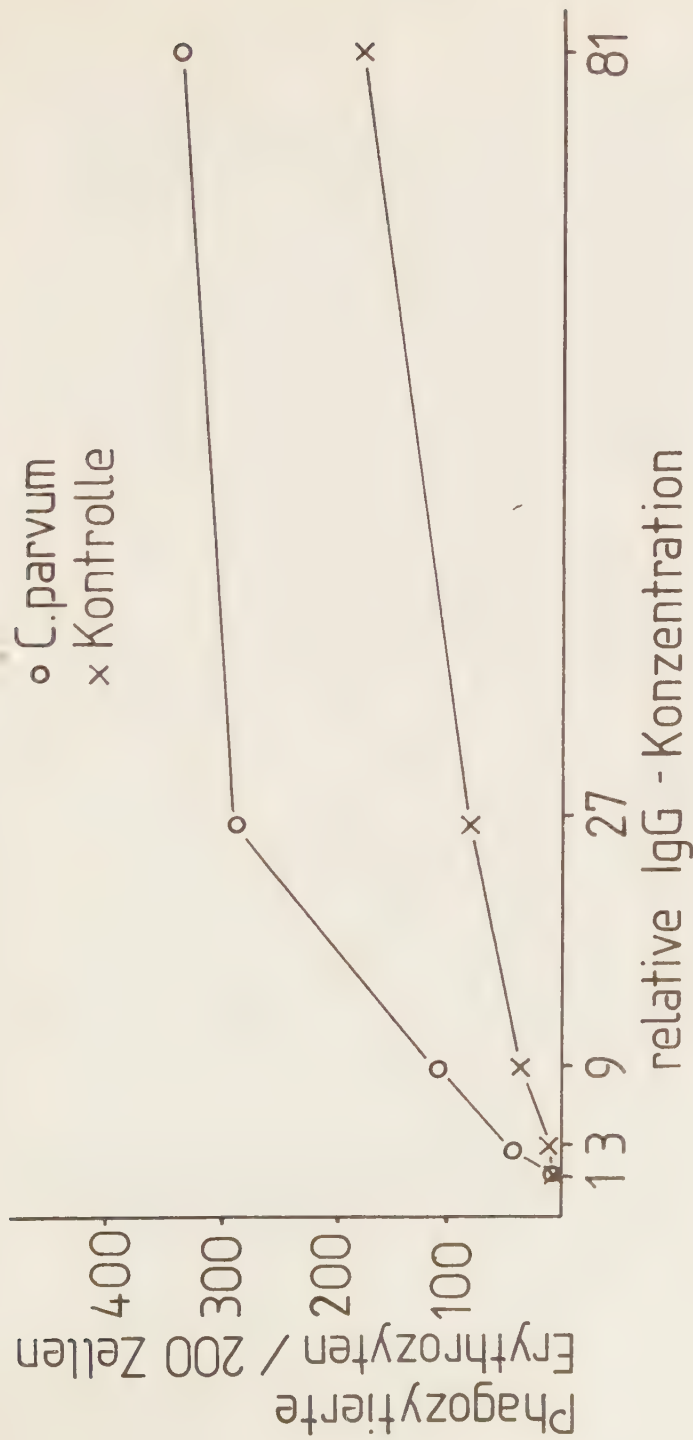


Abb. 5 : Phagozytose von Schaefferthrombozyten durch Peritonealmakrophagen normaler und *Corynebacterium parvum* - behandelte Mäuse bei Opsonisierung mit verschiedenen Konzentrationen gereinigter IgG - Antikörper. Darstellung des Versuchs 3 aus Tab. 5 .

Minuten gemessen.

Wiederum zeigte sich, daß die Phagozytoseleistung aktivierter Makrophagen gegenüber den Kontrollen signifikant gesteigert war (Tab. 6). Die Steigerung betrug im Durchschnitt 118%.

Der Ausfall zweier Experimente ist in Abb. 6 grafisch dargestellt (Vers. 1 und 6 aus Tab. 6).

Partikel, die mit gereinigten IgM - Antikörpern ohne Komplementzusatz opsonisiert waren, wurden von nicht aktivierten Makrophagen nicht phagozytiert. Auch nach *Corynebacterium parvum* - Behandlung ergab sich keine signifikante Steigerung der Phagozytose.

3.6 Auftreten einer Erkennungsfähigkeit für C4b (vom Meerschweinchen) bei *Corynebacterium parvum* - aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus

Das im Folgenden beschriebene Experiment hatte zum Ziel, die beobachtete Phagozytosesteigerung gegenüber Komplement - opsonisierten Schaferythrozyten durch Verwendung gereinigter Komplementkomponenten zu konsolidieren.

Da es nicht möglich war, gereinigte Komplementkomponenten aus Mäuseserum zu erhalten, wurden gereinigte Komponenten von Meerschweinchen benützt.

Insgesamt wurden 8 Versuche durchgeführt, wobei die Zellen von jeweils 3 Tieren für eine Versuchseinheit gepoolt wurden. Die für die Opsonisierung benützte IgM - Verdünnung betrug wiederum 1 / 250. Komplementanlagerung erfolgte wie unter Materialien und Methoden beschrieben. Die Phagozytose wurde nach 60 Minuten gemessen.

Wie aus Tab. 7 hervorgeht, war Meerschweinchenkomplement in der Lage, die Phagozytoseleistung aktivierter Mäusemakrophagen zu steigern. Überraschenderweise wurden aber auch Erythrozyten, die mit IgMC142 opsonisiert waren (die also kein C3b trugen), von aktivierten Makrophagen aufgenommen (statistisch signifikante

Tab. 6

Phagozytose von Schaferythrozyten durch Peritoneal-
makrophagen *Corynebacterium parvum* - behandelter
Mäuse bei Opsonisierung mit IgM und Mäusekomplement.

Vers. Nr.	Phagozytierte Erythrozyten ¹⁾	
	C. parvum	Kontrolle
1 ²⁾	168	103
2	132	81
3	68	43
4	259	125
5	84	35
6 ²⁾	299	125
7	335	75
8	220	107

1) pro 200 ausgezählte Makrophagen

2) grafisch dargestellt in Abb. 6

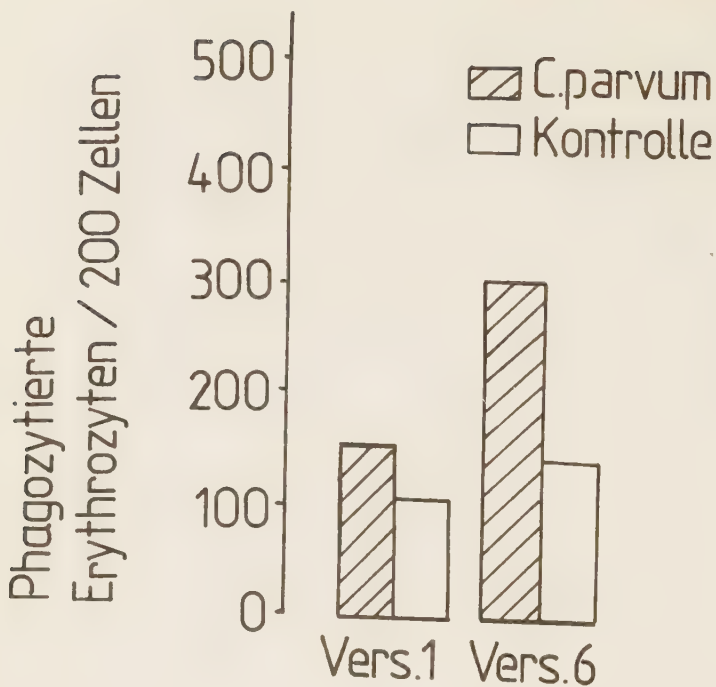


Abb. 6 : Phagozytose von Schafererythrozyten durch Peritonealmakrophagen *Corynebacterium parvum* - behandelter Mäuse bei Opsonisierung mit IgM und Mäusekomplement. Grafische Darstellung der Versuche 1 und 6 aus Tab. 6 .

Erhöhung der Phagozytoserate bei Opsonisierung mit IgMC142 gegenüber Opsonisierung mit IgM, jedoch keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Ergebnissen bei IgMC1423 - und IgMC142 - Opsonisierung). Der Ausfall dieses Experimentes zeigt, daß Mäusemakrophagen im Verlauf der Aktivierung durch *Corynebacterium parvum* offenbar eine Erweiterung ihrer Erkennungsfähigkeit für Opsonine erfahren, die sich auf die Erkennung heterologen Komplements (C4b) erstreckt.

Die Versuche 1 und 2 aus Tab.7 sind in Abb. 7 grafisch dargestellt.

3.7 Vergleich der Phagozytosesteigerung bei Mäuseritonealmakrophagen nach Stimulierung durch *Corynebacterium parvum* und Thioglykolat

Da Thioglykolat ein starker Stimulator der Makrophagenaktivierung ist, wurde im folgenden Versuch die aktivierende Wirkung von *Corynebacterium parvum* mit derjenigen von Thioglykolat verglichen. Die Behandlung der Versuchstiere erfolgte entweder durch intraperitoneale Injektion von 2 ml Thioglykolat - Bouillon oder durch intravenöse Gabe von 1,96 mg *Corynebacterium parvum* (2 bzw. 7 Tage vor Auswaschen der Peritonealzellen). IgG wurde als Opsonin in einer Konzentration von 1 / 600 verwandt (optimaler Phagozytosebereich, siehe Tab. 5 und Abb. 5). Die Phagozytosedauer betrug 60 Minuten.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme der opsonisierten Schaferythrozyten durch Makrophagen, die auf die beiden Arten aktiviert worden waren (Tab. 8 und Abb. 8). Daraus kann gefolgert werden, daß sowohl *Corynebacterium parvum* als auch Thioglykolat eine Steigerung der Phagozytosefähigkeit etwa gleichen Ausmaßes bewirken.

Tab. 7

Phagozytose von Schaferythrozyten durch Peritonealmakrophagen *Corynebacterium parvum* - behandelte Mäuse bei Opsonisierung mit IgM und Meerschweinchen - Komplement.

Auftreten einer signifikant gesteigerten Phagozytose bei Opsonisierung mit IgMC1423 sowie bei Opsonisierung mit IgMC142.

Anwendung von C3 in zwei Verdünnungsstufen (1 / 3 , 1 / 27).

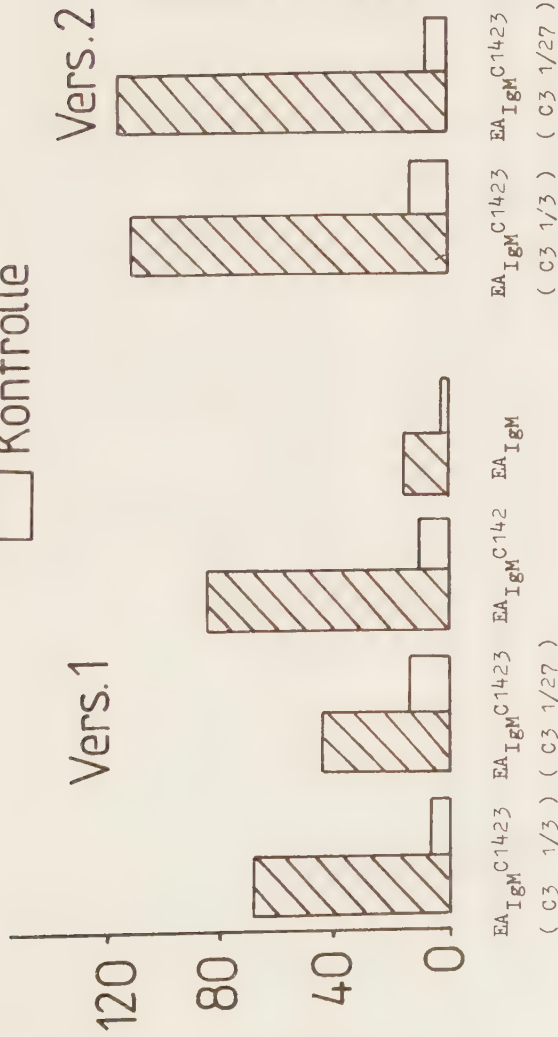
EA	Versuch Nr.	1 1)		2 1)		3		4		5		6		7		8	
		Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K	Cp	K
EA _{IgM} C1423 (C3 1/3)		64	4	98	12	57	11	29	1	101	60	106	1	120	12	74	23
EA _{IgM} C1423 (C3 1/27)		41	11	102	8	41	6	11	1	123	10	114	1	147	1	83	14
EA _{IgM} C142		79	5	88	10	35	6	32	1	84	11	135	1	139	1	85	16
EA _{IgM}		9	1	24	1	8	3	3	1	6	1	27	1	55	6	15	1

1) grafisch dargestellt in Abb. 7

Cp = *Corynebacterium parvum* - Behandlung
K = Kontrolle

Phagozytierte
Erythrozyten / 200 Zellen

▨ C. parvum
□ Kontrolle



- 29 -

Abb. 7 : Phagozytose von Schaferythrozyten durch Peritonealmakrophagen *Corynebacterium parvum*-behandelter Mäuse bei Opsonisierung mit IgM und Komplementkomponenten vom Meerschweinchen. Darstellung der Versuche 1 und 2 aus Tab. 7 .

Tab. 8

Phagozytose von opsonisierten Schafererythrozyten durch
Peritonealmakrophagen *Corynebacterium parvum* - und
Thioglykolat - stimulierter Mäuse.

Vers. Nr.	Phagozytierte Erythrozyten ¹⁾	
	<i>C. parvum</i>	Thioglykolat
1	582	512
2	449	444
3	453	428
4 ²⁾	504	499
5	510	607
6	678	640
7	617	458
8 ²⁾	654	656

1) pro 200 ausgezählte Makrophagen

2) grafisch dargestellt in Abb. 8

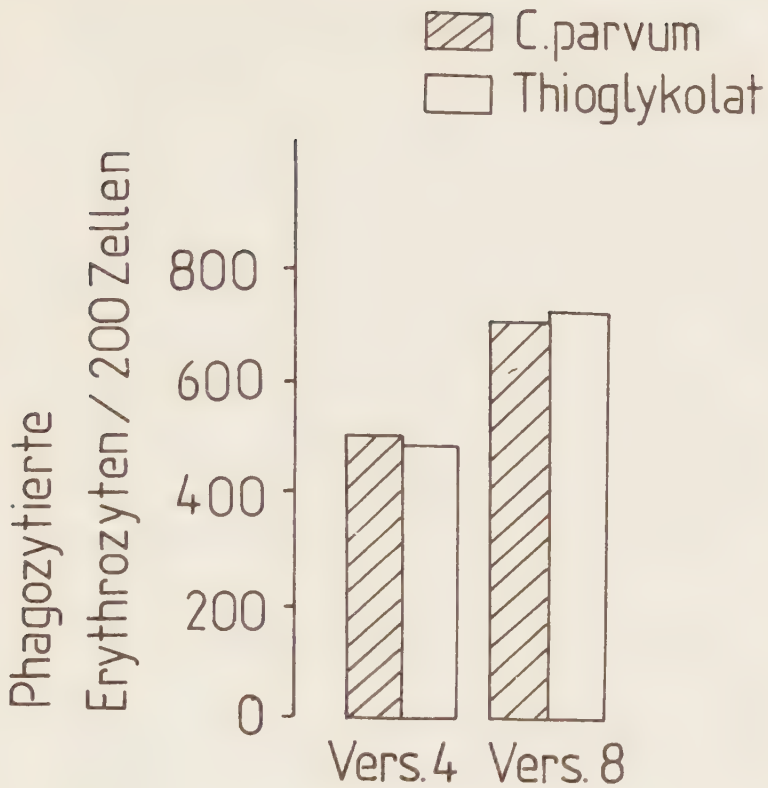


Abb. 8 : Vergleich der Phagozytosesteigerung von Mäuseperitonealmakrophagen nach Stimulierung durch *Corynebacterium parvum* bzw. Thioglykolat. .
Grafische Darstellung der Versuche 4 und 8 aus Tab. 8 .

4.

DISKUSSION

Die Leistung von Makrophagen und anderer an der Immunabwehr beteiligter Komponenten kann durch exogene Einflüsse gesteigert werden. Dies wird als Immunstimulation bezeichnet. Eine Vielzahl von Autoren konnte zeigen, daß den zellulären Immunfaktoren und in diesem Zusammenhang den Makrophagen als Effektorzellen besondere Bedeutung zukommt. Über Immunstimulation und Aktivierung der Makrophagen ist die Hemmung von Tumorwachstum möglich (6, 15, 16, 21, 22, 23, 24, 47). Ebenso ist ein schützender Effekt gegenüber bakteriellen Infektionen beschrieben (1, 27, 28, 44). Die Grundlagen für detailliertere Untersuchungen mit dem Ziel der klinisch - therapeutischen Anwendung sind damit geschaffen (Tumorthherapie, Behandlung immungeschwächter Patienten bei Infektionen infolge von Agranulozytose, Leukämie, immunsuppressiver Therapie usw.).

Somit kommt den Makrophagen eine zentrale Bedeutung als Gegenstand der Forschung zu. Sie sind wegen ihrer spezifischen und unspezifischen Aktivierbarkeit, d.h., wegen ihrer durch äußere Einflüsse zu steigernden Funktion, für die Zwecke der Immunstimulation besonders geeignet. Eine Aktivierung von Makrophagen ist bereits in natürlichen Systemen wie etwa Parasit - Wirtsbeziehungen bei Infektionen mit BCG oder Listerien nachweisbar (3, 30). Ziel der Immunstimulation muß es sein, diese natürlich auftretenden Prozesse auf pharmakologischem Wege zu kopieren.

Ein besonders wirkungsvolles Stimulans für Makrophagen stellt *Corynebacterium parvum* dar. Erhöhte Phagozytoseaktivität (32), Schutz bei bakteriellen (1, 39) und Protozoen - Infektionen (38) wurden beschrieben. Ein hemmender Effekt auf das Wachstum von Tumoren wurde ebenfalls nachgewiesen (8, 11, 35, 45, 46).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit *Corynebacterium parvum* zwei Parameter der Makrophagenaktivierung, Bakterizidie und Phagozytose, zu beeinflussen vermag.

Der erste Teil der Arbeit zeigt, daß *Corynebacterium parvum* zu einer gesteigerten Abtötungsleistung von Makrophagen gegenüber *Listerien* *in vitro* führt. Dies geschieht ohne Bildung einer vermehrten Anzahl von Peritonealmakrophagen (Tab. 2). Die Verbesserung der Funktion ist also auf Veränderungen am einzelnen Makrophagen zurückzuführen, wie sie in morphologischen und biochemischen Untersuchungen bereits beschrieben sind (14, 29, 37). Die erhobenen Befunde stehen im Einklang mit anderen Arbeiten (1), in denen durch *Corynebacterium parvum* erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen mit *Brucella abortus*, *Bordetella pertussis* und *Staphylokokkus aureus* nachgewiesen wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zunächst eine erhöhte Aufnahme von Erythrozyten durch Makrophagen nach Behandlung mit *Corynebacterium parvum* gefunden. Die Opsonisierung erfolgte dabei mit dem IgG - Anteil eines Antikörpergemisches. Erhöhte Phagozyten - Aktivität ist aus anderen Arbeiten mit differenter Versuchsanordnung bereits bekannt (32).

Untersuchungen zur Kinetik der Partikelaufnahme machen deutlich, daß sich die Makrophagenaktivierung neben der insgesamt erhöhten Phagozytoserate in einer besonders verstärkten Aufnahme in der Frühphase des Versuches ausdrückt.

Die oben dargestellten Ergebnisse wurden in Versuchen mit gereinigtem IgG als Opsonin bestätigt. Interessanterweise ist der Effekt von *Corynebacterium parvum* auch bei nicht optimaler Opsonisierung besonders ausgeprägt.

Die beiden letzten Versuche zeigen demnach, daß durch *Corynebacterium parvum* gerade in kritischen Situationen

(Frühphase einer Infektion mit der Möglichkeit rascher Eindämmung oder mangelhafte Bereitstellung von Antikörpern infolge Kachexie, kongenitalem Mangelsyndrom u.s.w.) eine bessere Phagozytoseleistung zu erwarten ist.

Wurde IgM und Mäuseserum (als Komplementquelle) benützt, so ließ sich ebenfalls ein phagozytosesteigernder Effekt durch *Corynebacterium parvum* nachweisen.

Experimente mit IgM und gereinigten Komplementkomponenten (vom Meerschweinchen) förderten ein über-raschendes Ergebnis zu Tage. Wie erwartet führte *Corynebacterium parvum* zu einer Steigerung der Phagozytose bei Opsonisierung mit IgMC1423. Die Phagozytose ist hier C3b - abhängig. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen anderer Autoren (19, 20, 31). Eine in gleichem Maße erhöhte Phagozytose wurde jedoch auch nach Opsonisierung mit IgMC142 gefunden. Dieser Befund ließ die Mutmaßung aufkommen, daß Makrophagen durch *Corynebacterium parvum* - Aktivierung eine neue Erkennungsfähigkeit für C4b erhalten. Tatsächlich ließ sich in weiterführenden Untersuchungen zeigen, daß im Verlauf der Aktivierung eine C4b - Rezeptoraktivität auftritt, die für die Phagozytose verantwortlich ist (43).

Die Gegenüberstellung der Phagozytose nach *Corynebacterium parvum* - bzw. Thioglykolat - Behandlung zeigt, daß in beiden Fällen offenbar eine optimale Stimulation der Makrophagen erreicht wird.

Corynebacterium parvum stellt somit ein geeignetes Stimulans zur Makrophagenaktivierung dar. Dies äußert sich in gesteigerter Abtötungsleistung gegenüber *Listerien* und in erhöhter Phagozytoserate für Erythrozyten. Ergänzend hierzu fanden sich Hinweise dafür, daß während der Aktivierung eine Rezeptoraktivität für heterologes C4b auftritt. Im Rahmen der Aktivierung kommt es somit zu einer Erweiterung der Erkennungsfähigkeit von Makrophagen für Opsonine.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivierung von Mäusemakrophagen durch *Corynebacterium parvum* führt zu einer gesteigerten Abtötung von *Listeria monocytogenes* *in vitro*.

Es tritt eine erhöhte Phagozytosefähigkeit gegenüber Erythrozyten auf, die mit IgG, IgM und Mäuseserum oder IgM und heterologem C3b opsonisiert wurden.

Darüberhinaus sind aktivierte Makrophagen in der Lage, C4b (Meerschweinchen) zu erkennen und auf diese Weise eine gesteigerte Phagozytose zu vermitteln.

Sowohl mit *Corynebacterium parvum* als auch mit Thio-glykolat läßt sich eine Steigerung der Phagozytose IgG - opsonisierter Erythrozyten erzielen.

Die Aktivierung durch *Corynebacterium parvum* führt zu einer Phagozytosesteigerung, die rascher einsetzt als bei Kontrollen und vor allem auch bei nicht optimaler Opsonisierung effektiv ist.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ADLAM, C., E.S.BROUGHTON, M.T.SCOTT
Enhanced resistance of mice to infection with bacteria
following pre - treatment with *Corynebacterium parvum*
Nature (London) *New Biol.* 235: 219 (1972)
- 2 ADLAM, C., M.T.SCOTT
Lympho-reticular stimulatory properties of
Corynebacterium parvum and related bacteria
Medical Microbiology 6: 261 (1973)
- 3 ATKINSON, J.P., M.M.FRANK
The effect of *Bacillus Calmette-Guérin*-induced
macrophage activation on the in vivo clearance
of sensitized erythrocytes
Journ.Clinic.Investig. 53: 1742 (1974)
- 4 AXLINE, S.G., Z.A.COHN
In vitro induction of lysosomal enzymes by phagocytosis
J.exp.Med. 133: 1239 (1970)
- 5 BIANCO, C., F.M.GRIFFIN JR., S.C.SILVERSTEIN
Studies of the macrophage complement receptor. Alteration
of receptor function upon macrophage activation
J.exp.Med. 141: 1278 (1975)
- 6 BURNET, F.M.
Immunological surveillance
Pergamon Press, LTD., Oxford (1970)
- 7 COLTEN, H.R., H.E.BOND, T.BORSOS, H.J.RAPP
Purification of the first component of complement
by zonal ultracentrifugation
J.Immunol. 103: 862 (1969)
- 8 CURRIE, G.A., M.D.BAGSHAW
Active immunotherapy with *Corynebacterium parvum*
and chemotherapy in murine fibrosarcomas
Brit.Medical J. 1: 541 (1970)

- 9 DANNENBERG JR., A.M., M.ANDO, O.ROJAS-ESPINOSA, K.SHIMA, T.TSUDA
Macrophage activation in tuberculous lesions. In
"Activation of Macrophages" Editors W.H.WAGNER, H.HAHN
Excerpta Medica, Amsterdam, p. 223 (1974)
- 10 FAUVE, R.M., M.B.HEVIN
Pouvoir bactéricide des macrophages spléniques et
hépatiques de souris envers *Listeria monocytogenes*
Ann.Inst.Pasteur 120: 399 (1971)
- 11 FISHER, J.C., W.R.GRACE, J.A.MANNICK
The effect of nonspecific immune stimulation with
Corynebacterium parvum on patterns of tumor growth
Cancer 26: 1379 (1970)
- 12 GIGLI, I., R.A.NELSON JR.
Complement dependent immune phagocytosis
Exp.Cell Res. 51: 45 (1968)
- 13 GRIFFIN JR., F.M., C.BIANCO, S.C.SILVERSTEIN
Characterization of the macrophage receptor for complement
and demonstration of its functional independence from the
receptor for the Fc portion of immunoglobulin G
J.exp.Med. 141: 1269 (1975)
- 14 HEISE, E.R., Q.N.MYRUIK, E.S.LEAKE
Effect of *Bacillus Calmette-Guérin* on the levels of acid
phosphatase, lysozyme and cathepsin in rabbit alveolar
macrophages
J.Immunol. 95: 125 (1965)
- 15 HELLSTRÖM, K.E., I.HELLSTRÖM
Cellular immunity against tumour antigens
Adv.Cancer Res. 12: 162 (1969)
- 16 HIBBS, J.B., L.H.LAMBERT, J.S.REMINGTON
Possible role of macrophage mediated nonspecific
cytotoxicity in tumour resistance
Nature 235: 48 (1972)
- 17 HOWARD, J.G., G.H.CHRISTIE, M.T.SCOTT
Biological effects of *Corynebacterium parvum*
IV. Adjuvant and inhibitory activities on B Lymphocytes
Cell.Immunol. 7: 290 (1973)

- 18 HUBER, H., S.D.DOUGLAS, H.H.FUDENBERG
The IgG receptor : an immunological marker for the
characterization of mononuclear cells
Immunology 17/7: 7 (1969)
- 19 HUBER, H., M.J.POLLEY, W.D.LINSCOTT, H.H.FUDENBERG
H.J.MÜLLER-EBERHARD
Human monocytes : distinct receptor sites for the
third component of complement and for immunoglobulin G
Science 162: 430 (1968)
- 20 HUBER, H., M.WEINER
Binding of immune complexes to human macrophages:
the role of membrane receptor sites. In "Activation
of Macrophages" Editors W.H.Wagner, H.Hahn
Excerpta Medica, Amsterdam, p. 54 (1974)
- 21 KELLER, R.
Beziehungen zwischen Tumorstadium und Immunität
Schweiz.med.Wschr. 102: 1148 (1972)
- 22 KELLER, R.
Cytostatic elimination of syngenic rat tumor cells
in vitro by nonspecifically activated macrophages
J.exp.Med. 138: 625 (1973)
- 23 KELLER, R., M.W.HESS
Role of activated macrophages in the suppression of
tumour growth. In "Activation of Macrophages"
Editors W.H.Wagner, H.Hahn
Excerpta Medica, Amsterdam, p. 291 (1974)
- 24 KLEIN, G.
Experimental studies in tumour immunology
Fed.Proc. 28: 1739 (1969)
- 25 KOSTER, F.T., D.D.McGREGOR, G.B.MACKANESS
The mediator of cellular immunity II. Migration of
immunologically committed lymphocytes into
inflammatory exsudates
J.exp.Med. 133: 400 (1971)

- 26 LURIE, M.B.
"Resistance to tuberculosis" Experimental studies
in native and acquired defensive mechanisms
Harvard University Press, Cambridge (1964)
- 27 MACKANESS, G.B.
Delayed hypersensitivity and the mechanism of cellular
resistance to infection. In "Progress in Immunology"
Editor B.Amos
Academic Press, New York, p. 413 (1971)
- 28 MACKANESS, G.B.
The immunology of antituberculous immunity
Amer.Rev.resp.Dis. 97: 337 (1968)
- 29 MACKANESS, G.B.
The monocyte in cellular immunity
Semin.in Hematol. 7/2: 172 (1970)
- 30 MACKANESS, G.B.
Cellular resistance to infection
J.exp.Med. 116: 381 (1962)
- 31 MANTOVANI, B., M.RABINOVITCH, V.NUSSENZWEIG
Phagocytosis of immune complexes by macrophages
Different role of the macrophage receptor sites for
complement (C3) and for immunoglobulin (IgG)
J.exp.Med. 135: 780 (1972)
- 32 McBRIDE, W.H.
Increased phagocytic cell activity and anaemia
in Corynebacterium parvum treated mice
Brit.J.Exp.Pathol. 55/1: 38 (1974)
- 33 MCGREGOR, D.D., H.HAHN, G.B.MACKANESS
The mediator of cellular immunity V. Development of
cellular resistance to infection in thymectomized rats
Cell.Immunol. 6: 186 (1973)
- 34 MCGREGOR, D.D., F.T.KOSTER, G.B.MACKANESS
The mediator of cellular immunity I. The life-span and
circulation dynamics of the immunologically committed
lymphocyte
J.exp.Med. 133: 389 (1971)

- 35 MILAS, L., H.MUJAGIC
Protection by *Corynebacterium parvum* against
tumour cells injected intravenously
Revue Européenne d'Etudes Cliniques et Bacteriolog.
17: 498 (1972)
- 36 NEVEU, T., A.BRANELLEC, G.BIOZZI
Propriétés adjuvantes de *Corynebacterium parvum* sur la
production d'anticorps et sur l'induction de l'hyper-
sensibilité retardée envers les protéines conjuguées
Ann.Inst.Past. 106: 771 (1964)
- 37 NORTH, R.J., G.B.MACKANESS
Electronmicroscopical observations on the peritoneal
macrophages of normal mice and mice immunised with
Listeria monocytogenes
Brit.J.Exp.Path. 44: 601 (1963)
- 38 NUSSENZWEIG, R.S.
Increased nonspecific resistance to malaria produced
by administration of killed *Corynebacterium parvum*
Exp.parasitol. 21: 224 (1967)
- 39 PHILIPPON, A., A.KAZMIERCZAK, P.NEVOT
Traitement de la brucellose de la souris par les
antibiotiques (Tétracycline, Ampicilline, Triméthoprime-
Sulfaméthoxazole) en association avec *Corynebacterium*
parvum
Ann.Inst.Past. 123: 349 (1972)
- 40 RAPP, H.J., T.BORSOS
Molecular basis of complement action
Appleton-Century-Crofts New York (1970)
- 41 STUBBS, M., A.V.KÜHNER, E.A.GLASS, J.R.DAVID, M.KARNOVSKY
Metabolic and functional studies on activated
mouse macrophages
J.exp.Med. 137: 537 (1973)
- 42 VAN FURTH, R., Z.A.COHN, J.G.HIRSCH, J.H.HUMPHREY,
W.G.SPECTOR, H.L.LANGEVOORT
The mononuclear phagocyte system : a new classification
of macrophages, monocytes and their precursor cells
Bull.Wld Hlth Org. 46: 845 (1972)

- 43 WELLEK, B., G.KESSEL, M.LOOS, H.HAHN
Increase of phagocytic activity and new appearance
of a C4b (guinea pig) recognizing capability in
peritoneal macrophages from Corynebacterium parvum
and Thioglycollate-stimulated mice
In Monographs in Allergy Editor P.Kallos et al.
Karger, Basel, 12: 105 (1977)
- 44 WHITE, R.G., G.J.O'NEILL, D.C.HENDERSON, J.CATER, P.C.WILKINSON
The adjuvant activity of Corynebacterium parvum in
specific and non-specific immunity. In "Non Specific
Factors Influencing Host Resistance" Editors W.Braun,
J.Ungar, Karger, Basel, p. 285 (1973)
- 45 WOODRUFF, M.F.A., J.L.BOAK
Inhibitory effect of injection of Corynebacterium parvum
on the growth of tumour transplants in isogenic hosts
Brit.J.Cancer 20: 345 (1966)
- 46 WOODRUFF, M.F.A., N.DUNBAR, A.GHAFFAR
The growth of tumours in T-cell deprived mice and their
response to treatment with Corynebacterium parvum
Proc.R.Soc.Lond. 184: 97 (1973)
- 47 YASHPHE, D.J.
Immunological factors in non specific stimulation
of host resistance in syngeneic tumours
Isr.J.Med.Sci. 7: 90 (1971)

Für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung während der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. H. Hahn zu großem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr. B. Wellek für ihre wertvolle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. J. Berger danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Für die technische Assistenz danke ich Frau C. Berger, Frau S. Rumpf, Frau I. Kröhl und Fräulein J. Brockmann.

LEBENS LAUF

Geburt:	in Rehbach / Kreis Kreuznach	28.2.1949
Eltern:	Landwirt Hans Keßel und Frieda Keßel geb. Spang	
Familien- stand:	verheiratet mit der Lehrerin Hiltrud Keßel geb. Eckhardt eine Tochter Sabine	1974
Schule:	Grundschule in Saarbrücken Hauptschule in Winterburg Staatl. Aufbaugymnasium Alzey	1955 - 1959 1959 - 1963 1964 - 1970
Abitur:	Staatl. Aufbaugymnasium Alzey	Juni 1970
Studium:	der Medizin in Mainz	WS 70 - SS 76
Examen:	Staatsexamen der Medizin in Mainz	Juli 1976
Medizinal- assisten- tenzeit:	I. Med. Universitätsklinik in Mainz Stadtkrankenhaus Rüsselsheim	Dez. 76 - März 77 April - Dez. 77
Approbation:		Januar 1978
Jetzige Tätigkeit:	Ableistung des Wehrdienstes als Stabsarzt der Bundeswehr im Sanitätsausbildungszentrum 861 in Rhaunen / Hunsrück	

Die im Abschnitt 3.6 beschriebenen Versuche
wurden bereits veröffentlicht:

Increase of Phagocytic Activity and New
Appearance of a C4b (Guinea Pig) Recognizing
Capability in Peritoneal Macrophages from
Corynebacterium parvum and
Thioglycollate-Stimulated Mice¹

B. Wellek, G. Kessel, M. Loos and H. Hahn

Department of Medical Microbiology,
Johannes-Gutenberg University, Mainz, and
Department of Medical Microbiology,
Ruhr-University, Bochum

Monogr. Allergy, vol. 12, pp. 105 - 110
(Karger, Basel 1977)

